
Rapport de mission d'appui en phytopathologie sur la problématique du flétrissement bactérien sur Solanacées, en Guyane

7-9 décembre 2010

*Appui méthodologique ; rencontre des différents acteurs et
visites de terrains ; discussions et échanges sur les
collaborations à développer en partenariat*

Péninna DEBERDT

CIRAD-UR HORTSYS

Pôle de Recherche Agro-environnementale de la Martinique (PRAM), BP 214,
Quartier Petit Morne, 97285, Le Lamentin Cedex2, Martinique

Résumé

L'objectif de cette mission était de transférer des compétences techniques en microbiologie classique pour l'isolement de *R. solanacearum* à un agent de la FREDON, Francis Vigné. Ce transfert de compétences qui permettra à la FREDON de constituer une collection de souches guyanaises de *R. solanacearum*, a porté sur (i) l'isolement microbiologique de l'agent *Ralstonia solanacearum* à partir d'échantillons de Solanacées (tomate et aubergine), (ii) l'identification des morphotypes de *R. solanacearum* sur milieux de cultures, (iii) la purification des souches et (vi) la mise en collection de ces souches. Au cours ma mission, j'ai réalisé des visites de terrains qui concernaient des essais expérimentaux mis en place au lycée agricole de Matiti ainsi que chez les agriculteurs sur la commune de Javouhey, ces essais étant coordonnés par différents organismes (FREDON, SPV, OP-APFFLG, EPLEFPA). Des échantillons de plants atteints de flétrissement bactérien ont été prélevés dans chaque site visité pour la réalisation de sessions de travaux pratiques, pour le transfert des techniques de microbiologie. Les souches de *R. solanacearum* isolées et mises en collection dans le cadre de ma mission ont été importées en Martinique pour une caractérisation génétique au laboratoire de biologie moléculaire du PRAM. Les activités de recherche réalisées au PRAM ont été exposées au SPV-DAF Guyane, FREDON Guyane, CIRAD Kourou et EPLEFPA de la Guyane), exposé suivi d'une discussion générale. Des perspectives de collaborations ont été avancées et pourraient faire l'objet de la co-construction d'un projet commun avec les différents acteurs guyanais et martiniquais autour de la problématique du flétrissement bactérien.

Contexte

Le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* est une maladie d'origine tellurique responsable de dégâts considérables sur les cultures maraîchères en Guyane et principalement sur les solanacées. La mise en place d'une stratégie de lutte intégrée passe tout d'abord par la connaissance des populations de l'agent pathogène. Il apparaît urgent dans un premier temps d'acquérir des compétences sur les techniques de microbiologie pour l'isolement de l'agent pathogène et la constitution d'une collection de souches guyanaises. La caractérisation génétique des souches de *R. solanacearum* permettra de connaître les populations guyanaises de *R. solanacearum* et ainsi de mieux orienter les programmes de recherche-développement pour une gestion durable du flétrissement bactérien.

Objectifs de la mission

Appui méthodologique pour la réalisation d'isollements des souches de *Ralstonia solanacearum* et mise en collection/ Rencontre des différents acteurs et visites des essais expérimentaux en cours. Présentation des activités de recherche au PRAM sur la gestion agroécologique du flétrissement bactérien / Discussion et échanges sur les collaborations à développer en partenariat.

Positionnement et coordination de la mission

Pour répondre à la problématique du flétrissement bactérien sur solanacées en Guyane, plusieurs actions sont actuellement en cours (Evaluations variétales, solarisation, etc.). En lien avec ces actions, le Service de la Protection des végétaux a diligenté une mission du CIRAD que j'ai eu l'honneur de réaliser, au mois de décembre 2010.

Cette période de l'année est en effet propice au développement du flétrissement bactérien dans les cultures de solanacées de plein champ et par conséquent s'accorde pleinement à la démonstration des techniques d'isolement de l'agent *R. solanacearum* sur échantillons frais de plantes.

Cette mission a été coordonnée par Pierre Bouteiller, chef de projet à l'EPLEFPA de la Guyane.

Programme prévisionnel de la mission de Guyane de Péninna Deberdt, CIRAD Martinique (PRAM)

Lundi 6 décembre

Arrivée à Cayenne à 19h25 (AF3974)

Accueil par Luc Lebreton (SPV)

Nuitée à Cayenne (Hotel des Amandiers)

Mardi 7 décembre

Départ de Cayenne à 7h

8h - 9h30 : Exploitation du lycée agricole de Matiti

Visite de l'expérimentation variétale de tomates au lycée agricole de Matiti

Prélèvement d'échantillons de plants atteints de flétrissement bactérien

9h30 – 11h30 : Laboratoire du lycée de Matiti

Session pratique et démonstration : Isolement bactériologique sur échantillons prélevés, démonstration de différentes techniques, mise en culture

11h30 – 15h30 : Trajet Cayenne- Javouhey

15h30 – 18h30 : Javouhey

Visite de l'expérimentation variétale de tomates pilotée par la FREDON chez Yang PAUL

Prélèvement d'échantillons de plants atteints de flétrissement bactérien

Nuitée à Javouhey (Relais de l'Acarouany)

Mercredi 8 décembre

7h30 – 9h : Javouhey

Visite de l'expérimentation de solarisation par le SPV et l'APFFLG chez Albert SIONG

Prélèvement d'échantillons de plants atteints de flétrissement bactérien

9h – 13h : Trajet Javouey-Cayenne

14h-17h : Cayenne

Présentation par P. DEBERDT de son programme de recherche au PRAM-Martinique et des perspectives de collaborations (Invitation par le SPV, lieu : DAF-Salle Visio).

Echanges et discussions pour la construction d'un projet commun avec les différents acteurs guyanais autour de la problématique du flétrissement bactérien.

17h-18h30 : Laboratoire du SPV

Session pratique et démonstration : Isolement bactériologique sur échantillons prélevés à Javouey, démonstration de différentes techniques, mise en culture

Nuitée à Cayenne (Hotel des Amandiers)

Judi 9 décembre

7h30 – 10h30 : Laboratoire du SPV, Cayenne

Session pratique et démonstration : Mise en collection des souches bactériennes / Repiquage des souches pour purification

Conclusion - synthèse de la mission

12h35 : Vol Cayenne – Fort-de-France (AF3971)

Personnes rencontrées et principaux organismes

Luc Lebreton (Chef SPV-DAF Guyane)

Damien Laplace (adjoint SPV-DAF Guyane)

Aubéri Petite (SPV-DAF Guyane)

Francis Vigné (FREDON Guyane)

Jean Guyot (CIRAD, basé à Kourou)

Elise Levasseur (APFFLG, Association de producteurs de fruits, fleurs et légumes de Guyane), Javouhey.

Albert Siong et Tchoua Ya (APFFLG, Association de producteurs de fruits, fleurs et légumes de Guyane), Javouhey

Pierre Bouteiller (EPLEFPA de la Guyane)

Frederic Biro, chef de cultures (EPLEFPA)

Jean Paul Cabanettes (Ingénieur du Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux).

Pierre Patureau (FREDON Guyane)

Visites de terrains

Au cours de ma mission, 3 visites de terrains ont été réalisées.

L'organisation professionnelle rencontrée a été la PFFLG (Association de Producteurs de Fruits, Fleurs et Légumes de Guyane)

1. Visite 1 : Evaluation variétale de tomates au lycée agricole de Matiti

Un essai expérimental pour l'évaluation de la résistance aux maladies de 5 variétés hybrides de tomate en provenance de l'INRA-Centre Antilles Guyane (Guadeloupe) a été mis en place fin octobre 2010 sur la station du Lycée Agricole de Matiti. Cet essai est coordonné par l'EPLEFPA de la Guyane (P. Bouteiller).

Cet essai n'a pas pu être mené selon le dispositif prévu de départ car les taux de germination des semis ont été très faibles : moins de 10%.

3 plants de tomate présentant des symptômes de flétrissement bactérien ont été échantillonnés : il s'agit de 2 plants du témoin Roma VF, **23-01** (1 plant ; **Fig.1**) & **23-02** (1 plant) et d'une **variété hybride TGP 01**. Ces plants ont été volontairement choisis sur les 3 blocs du dispositif prédéfinis dans le protocole de départ.



Figure 1. Plant de tomate : témoin Roma VF, 23-01

Etant donné le faible nombre de plants à un stade d'infestation intéressant dans l'essai variétal des variétés hybrides de tomate, des prélèvements ont été réalisés sur des parcelles adjacentes :

Parcelle de production de tomates

1 plant de tomate présentant des symptômes de flétrissement bactérien a été échantillonné : il s'agit de la variété « CARAÏB, improved Bacterial Wilt Tolerant », AGRINOVA.

Parcelle de production d'aubergines

2 plants d'aubergine présentant des symptômes de flétrissement bactérien ont été échantillonnés (**Fig.2 & 3**) : il s'agit de la variété « KALENDA », **Kalenda 01** (FB en cours) & **Kalenda 02** (FB stade avancé).



Figure 2. Plant d'aubergine, variété « KALENDA », atteint de flétrissement bactérien.



Figure 3. Prélèvement d'un segment de plant d'aubergine pour isolement bactériologique

Observations des systèmes racinaires :

Sur aubergines : les systèmes racinaires des plants d'aubergines échantillonnés ont subi de fortes attaques de nématodes à galles, ce qui pourrait expliquer le développement accru du flétrissement bactérien à un stade avancé de la culture ainsi que l'effet de « nanisme » observé sur les plants (**Fig.4**).



Figure 4. Présence de galles sur systèmes racinaires d'aubergines, variété « Kalenda »

Sur tomates de l'essai hybride : quelques galles ont été observées, plutôt jeunes, ce qui n'a pas eu d'effet direct sur le développement des plants.

Il est connu dans la littérature qu'il existe un effet synergique entre *R. solanacearum* et les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.). L'attaque de nématodes à galles est connue pour aggraver le développement du flétrissement bactérien.

Le type de sol sur la station du Lycée Agricole de Matiti est limono-sableux, propice au développement des nématodes phytoparasites.

Au total, 6 plants (mélange de tomate & aubergine) ont été prélevés sur les différentes parcelles (expérimentales et production) de la station du lycée de Matiti pour la réalisation d'une session pratique et transfert de compétences. L'isolement microbiologique a été réalisé sur place, au

laboratoire du lycée en présence de Aubéri Petite (SPV-DAF Guyane), Francis Vigné (FREDON Guyane), Luc Lebreton (SPV-DAF Guyane) et Pierre Bouteiller (EPLEFPA de la Guyane, Savane Matiti).

2. **Visite 2** : Evaluation variétale de tomates pilotée par la FREDON

Un essai expérimental pour l'évaluation de la résistance aux maladies des principales variétés de tomate choisies pour la disponibilité des semences sur le marché en Guyane (distribution par Technisem), est en phase de mise en place (décembre 2010) sur l'exploitation de M. Yang Paul, à Javouhey (commune de Mana). M. Yang Paul est membre de l'APFFLG. Cet essai est coordonné par la FREDON (P. Patureau). Les variétés à tester sont : Cranita, Sumo, Mongal, F1TW6, et Heatmaster. Des tomates greffées (porte greffe : *Solanum torvum*) seront aussi évaluées.

Etant donné que cet essai était en phase d'installation, nous n'avons pas pu échantillonner des plants de tomates atteints de flétrissement bactérien.

L'exploitation agricole de M. Yang Paul est une exploitation de cultures maraîchères (**Fig.5 & 6**).

Les cultures actuelles étaient le chou, le céleri, les concombres « sorossi », les aubergines, le poivron, l'oignon-pays. Les problèmes observés sur l'oignon-pays étaient principalement les marbrures causées par les mouches mineuses. Pas de problèmes de thrips soulevés par l'exploitant.

La pratique des rotations culturales est généralement réalisée après 2-3 cycles de cultures.

Le flétrissement bactérien n'étant pas observé sur les cultures de solanacées de l'exploitation agricole visitée, nous n'avons pas effectué de prélèvements de plants.



Figure 5. Exploitation maraîchère, Javouhey, Commune de Mana (M. Yang Paul).



Figure 6. Exploitation maraîchère. Récolte de céleri

3. **Visite 3** : Test de solarisation piloté par le SPV et l'APFFLG

Un essai expérimental pour l'évaluation de la technique de solarisation par bâche dans la lutte contre *R. solanacearum* a été mis en place fin octobre 2010 sur l'exploitation de M. Albert Siong de l'APFFLG, Javouey (commune de Mana). Cet essai est coordonné par le SPV et l'APFFLG (A. Petite & E. Levasseur), (**Fig.7 & 8**).

Cet essai a été réalisé selon le dispositif prévu de départ.

Trois traitements ont été réalisés :

T1 : culture d'aubergines cv « Kalenda » produits en pépinière sans solarisation

T2 : culture d'aubergines cv « Kalenda » produits en pépinière avec solarisation

T3 : culture d'aubergines « plants tout venant produits en plein champ » selon pratiques agricole de l'exploitant.



Figure 7. Essai solarisation sur culture d'aubergines.
Exploitation de M. Albert Siong de l'APFFLG,
Javouey, commune de Mana



Figure 8. Observation de plants d'aubergine atteints de flétrissement bactérien dans l'Essai solarisation.

Le stade de culture au jour de la visite était de 1 mois et 10 jours. Les plants des traitements T1 et T2 étaient en production ce qui n'était pas le cas dans le T3. Seul le traitement T1 présentait des plants atteints de flétrissement bactérien.

Les plants du traitement T2 présentaient un état physiologique avancé en comparaison aux autres traitements.

Le système d'irrigation pratiqué est le système de goutte à gouttes.

Le suivi cultural est réalisé selon les itinéraires techniques culturaux de l'exploitant agricole, A. Siong (fumure de fond, gestion des adventices, etc.).

Cet essai a été mis en place après 6 mois de jachère.

L'évolution des symptômes de flétrissement bactérien est enregistrée chaque semaine.

Parallèlement, une étude de la diversité microbienne est réalisée.

Trois plants d'aubergines présentant des symptômes de flétrissement bactérien ont été échantillonnés : **Kalenda 03**, **Kalenda 04** et **Kalenda 05**. Ces plants ont été choisis sur les 3 lignes du dispositif, à des distances variables (**Fig.9 & 10**).



Figure 9. Plants d'aubergine flétri, Traitement T1. Essai solarisation, M. Albert Siong.



Figure 10. Prélèvement d'un segment de plant d'aubergine pour isolement bactériologique.

La présence de galles n'a pas été observée sur les systèmes racinaires des plants échantillonnés.

Une plante adventice, ne présentant pas de symptômes visibles de la maladie, a aussi été prélevée au pied d'un plant d'aubergine flétri ; il s'agit de ***Portulaca oleracea*** (pourpier), (**Fig.11**). Cette espèce a été retrouvée de façon majoritaire dans la parcelle expérimentale.



Figure 11. Plant de *Portulaca oleracea* (pourpier) largement retrouvé parmi les adventices dans l'Essai solarisation

Autres maladies observées sur aubergines et signalées par A. Siong : attaques d'aleurodes en cas de forte chaleur et attaques de fourmis sur les fleurs (traitement insecticide efficace).

Au total, 4 plants (3 plants d'aubergine + 1 plant de pourpier) ont été prélevés sur la parcelle expérimentale de l'exploitation d'A. SIONG pour la réalisation d'une session pratique et transfert de compétences techniques en microbiologie. Les échantillons ont été acheminés le jour même à Cayenne. L'isolement microbiologique a été réalisé au laboratoire du SPV de Cayenne, en présence de Aubéri Petite (SPV-DAF Guyane) et de Francis Vigné (FREDON Guyane).

Remarques :

Il est important de noter les principaux modes de transmission de la bactérie : via les eaux d'irrigation, le matériel souillé, les adventices (hôtes réservoirs) présents dans la parcelle.

Il est important d'observer systématiquement les systèmes racinaires des plants malades afin de s'assurer de l'absence d'attaques de nématodes à galles qui engendrent une aggravation de l'épidémie du flétrissement bactérien.

Sessions pratiques et transfert de compétences techniques en microbiologie

1. Isolement bactérien, prélèvements d'échantillons de plantes, démonstration de différentes techniques et mise en culture sur milieux gélosés

Les échantillons de plantes prélevés dans le cadre de la « Visite 1 » (mardi) ont été acheminés au laboratoire du Lycée de Matiti. Les isoléments et démonstration ont été réalisés sur une paillasse de laboratoire équipée d'un bec bunsen. (**Fig. 12-14**).



Figure 12. Isolement microbiologique réalisé par F. Vigné.



Figure 13. Isolement microbiologique réalisé par A. Petite.



Figure 14. Paillasse du laboratoire du lycée de Matiti, équipée pour l'isolement Bbactériologique.

Les échantillons de plantes prélevés dans le cadre de la « Visite 3 » (mercredi) ont été acheminés au laboratoire du SPV de Cayenne. Les isoléments et démonstration ont été réalisés sur une

paillasse de laboratoire ainsi que sous une hôte à flux laminaire équipée d'un bec bunsen (du fait du manque d'entretiens réguliers de la hotte et de son utilisation réduite).

Les différentes techniques d'isolement démontrées ont été :

- Le test de l'eau
- La réalisation des emprunts sur milieux de culture
- Prélèvement direct d'exsudat bactérien sur segments de tige
- La dilacération des tissus + incubation dans tampon TRIS 0.01M pH 7.2 avant étalement sur milieux de culture

Deux milieux de cultures ont été utilisés :

Milieu Kelman K+ = milieu non sélectif & Milieu SMSA= milieu semi-sélectif.

L'étalement a été réalisé selon la technique des 3 secteurs permettant un étalement en dilutions successives. Les boîtes ensemencées ont été acheminées du laboratoire du SPV, Cayenne et mises à incuber à T° ambiante. La recommandation pour la T° optimale de croissance est 28°C, dans un incubateur de préférence.

Un protocole d'isolement et de purification des souches de *R. solanacearum* à partir d'un échantillon de plante est présenté en **Annexe 1**.

Cas des aubergines : les plants d'aubergines sont lignifiés et nous avons observé l'apparition rapide d'exsudats bactériens sur segments de tiges (**Fig.15**). Nous avons donc opté pour le prélèvement direct de l'exsudat bactérien sur segments de tiges, en s'affranchissant de la dilacération des tissus.



Figure 15. Exsudat bactérien sur segment de tige d'aubergine

2. Observation des cultures bactériennes /Mise en collection des souches bactériennes/ purification des souches de *R. solanacearum*

Lieu : Laboratoire SPV-Cayenne

Les isolats prélevés au cours des différentes visites de terrain ont été mis en culture et incubés au laboratoire du SPV de Cayenne.

La première série d'isolements (Visite 1) a pu être traitée.

Pour chaque plante échantillonnée :

- Des colonies de morphotype typique de *R. solanacearum* et distinctes ont été mises en collection après 24h d'incubation sur SMSA/Kelman K+ (**Fig. 16 & 17**) (sans purification et/ou repiquage sur milieu CPG : ceci a permis de réaliser une démonstration de mise en collection).
- Des colonies de morphotype typique de *R. solanacearum* ont été repiquées sur milieu CPG pour une mise en collection après incubation de 12 à 18h. Cette deuxième manipulation consiste à l'étape préliminaire de mise en collection. Après incubation de 12 à 18h, une colonie sera prélevée avec une anse de 1 µL et transférée dans des microtubes contenant 1 mL d'eau stérile. La solution sera ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex de paillasse. Les tubes seront stockés à T° ambiante.

Un protocole de conservation des souches de *R. solanacearum* est présenté en **Annexe 2**.

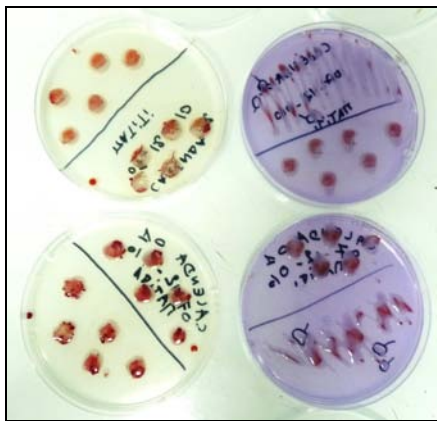


Figure 16. Culture bactérienne obtenue selon la méthode des empreintes de tiges sur milieu Kelman (gauche) et sur milieu SMSA (droit). Culture bactérienne selon la méthode de prélèvement direct d'exsudat bactérien sur les segments de tige (stries sur milieu SMSA, à droite).

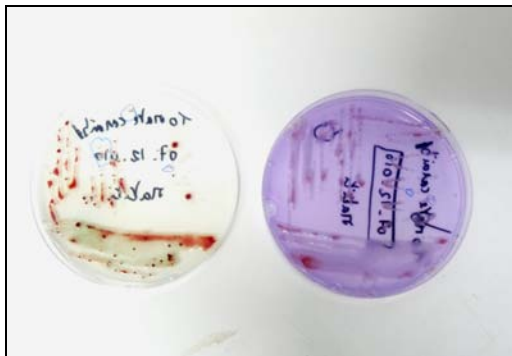


Figure 17. Culture bactérienne obtenue selon la méthode de la dilacération des tissus et incubation dans tampon TRIS. Résultats obtenus sur milieu Kelman (à gauche) et sur milieu SMSA (à droite).

Important : Lors de la mise en collection, penser à bien identifier le tube (N° de la souche, date de mise en collection) et enregistrer parallèlement dans un cahier d'enregistrement d'échantillons de plantes. Préparer deux tubes/ isolat.

3. Milieux de culture et solution Tampon utilisés

Nous avons utilisé les 3 principaux milieux de cultures utilisés pour *R. solanacearum*.

Les protocoles de préparation de ces milieux ainsi que celui de la solution Tampon TRIS sont présentés en **Annexe 3**. **L'Annexe 4** apporte des détails complémentaires pour la préparation du milieu semi-sélectif SMSA.

Réunion : présentation des activités de recherche et perspectives de collaborations

Une réunion a été organisée le mercredi 08/12/2010, à la DAF de Guyane, localisée à Cayenne.

L'ordre du jour de cette réunion a été le suivant :

1. Présentation orale des résultats de recherche au PRAM (Martinique) sur les plantes de services à potentiel assainissant pour la gestion intégrée du flétrissement bactérien en cultures maraîchères (Power Point exposé par Péninna DEBERDT)
2. Discussion et échanges pour une collaboration Antilles Guyane à développer sur la problématique du flétrissement bactérien.

Compte-rendu de la réunion

Etaient présents : Luc Lebreton (Chef SPV-DAF Guyane), Damien Laplace (SPV), Aubéri Petite (SPV), Francis Vigné (FREDON), Jean Guyot (CIRAD, basé à Kourou), Pierre Bouteiller (Lycée

de Matiti) et Jean Paul Cabanettes (Ingénieur du Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux).

Les Organisations Professionnelles Agricoles dont l'APFFLG ont été invitées mais n'ont pas pu se déplacer.

La réunion a commencé par un bref rappel par M. Lebreton des expérimentations en cours sur le Flétrissement bactérien en Guyane et des objectifs de la mission de Mme P. Deberdt en Guyane.

Une présentation intitulée : « Les plantes de service à potentiel assainissant dans la gestion intégrée du flétrissement bactérien en cultures maraîchères » a été exposée par P. Deberdt.

Cet exposé d'environ 30 minutes a été suivi d'une session de discussion et d'échanges avec les participants.

Les échanges et les discussions ont porté sur :

- (i) Les différences d'incidence de flétrissement observées pour un même cultivar (question posée par J. Guyot). Réponse : les différences observées sont liées au fait qu'il s'agit d'une résistance polygénique, fortement liées aux conditions environnementales. Ce type de résultats n'est pas étonnant. C'est pour cette raison que des cultivars sélectionnés hautement résistants dans un site géographique donné ne le sont plus dans un autre site.
- (ii) Le choix précis du programme d'un sujet de stage prévu pour la période Mars-Aout 2011. Une stagiaire d'AgroParisTech (ex INA-PG) réalisera son stage sur la problématique du flétrissement en Guyane. Ce stage sera co-encadré par Luc Lebreton (SPV), Stephane Traissac (AgroParisTech), Jean Guyot (CIRAD) et Pierre Bouteiller. P. Bouteiller propose de co-construire le sujet avec le stagiaire. Des remarques sont faites parmi les participants sur le fait que le sujet doit être ficelé avant l'arrivée du stagiaire. Une réunion est prévue la semaine du 17 janvier pour avancer sur ce sujet.
- (iii) Le choix des plantes de service à conseiller : parmi les espèces végétales prometteuses dans nos conditions expérimentales de Martinique, il serait intéressant de tout d'abord recenser les espèces locales potentiellement intéressantes présentes en Guyane. L'intérêt premier est de proposer aux agriculteurs une rotation avec des plantes de services économiquement rentables : d'où l'oignon pays (« ciboule ») qui suscite de l'engouement.
- (iv) Comment intégrer les résultats présentés ici dans une démarche à finalité économique ? Réponse : cet aspect n'a pas été traité par mon programme de recherche.
- (v) Quels sont les itinéraires techniques ? Réponse : des essais d'optimisations des ITC seront mis en place en 2011, en Martinique.
- (vi) Le fait que les plantes de services ne pourront pas à elles seules contrôler la maladie. En effet, il faudra combiner avec la résistance génétique et les méthodes culturales innovantes. A ce jour, nous n'avons pas de variétés tolérantes à la population émergente de *R. solanacearum* (frein majeur). Est ce que cette population est présente en Guyane ? Nous devons répondre à cette question au plus vite, puis réaliser un screening variétal afin de définir 1-2 variétés de tomate avec lesquelles travailler.
- (vii) L'intérêt de cette mission pour l'acquisition par la FREDON de l'autonomie pour l'isolement des souches de *R. solanacearum* et la réalisation d'une collection au cours du temps. Une fois l'acquisition faite, nous pourrions penser à co-construire un projet de recherche –développement.
- (viii) Les projets à co-construire ? La proposition d'un projet MOM pourrait faire l'objet d'une collaboration Antilles-Guyane, à court terme. Sur les aspects génotypiques, d'autres partenaires pourraient être intéressés (tels que E. Wicker, CIRAD réunion)
- (ix) Le fait que la recherche guyanaise actuelle ne concerne malheureusement pas la problématique des agriculteurs et qu'il va falloir trouver des moyens de travailler avec des experts.
- (x) Dans un contexte ECOPHYTODOM de réduction des pesticides, le SPV signale qu'il y a un réel manque d'acteurs de la Recherche-Développement, en Guyane.

- (xi) Les collègues du SPV-Guyane ont émis le souhait de venir en Martinique en 2011 rencontrer les collègues du CIRAD, FREDON et CTCS.

Remarque : Des fiches techniques sur les plantes de service candidates ainsi qu'un dossier comprenant les fiches descriptives des différents essais réalisés + fiche récapitulative des résultats 2009-2010 obtenus au PRAM ont été remises à Francis Vigné pour distribution auprès des participants de la réunion.

Conclusion de la mission et perspectives

L'objectif principal de ma mission a été atteint : la FREDON est en cours d'acquisition de l'autonomie pour l'isolement et la réalisation d'une bactériothèque pour l'agent *R. solanacearum*. Une fois que la FREDON aura entièrement acquis cette autonomie, nous pourrons co-construire un projet. D'autre part, les analyses PCR des souches guyanaises seront réalisées dès réception des isolats en provenance de Guyane. Les résultats permettront d'orienter les discussions et échanges pour la construction de projets.

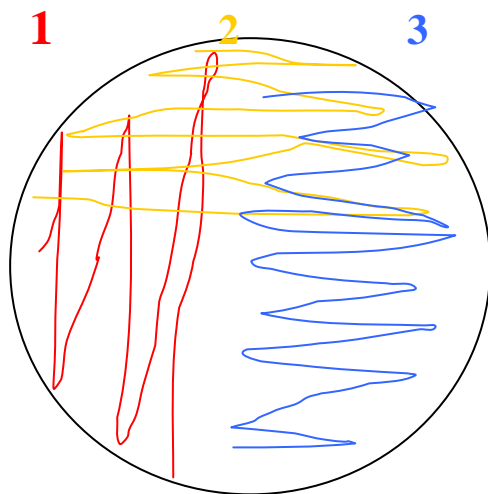
Francis Vigné souhaiterait effectuer un stage au sein de notre équipe. Cette proposition est entièrement envisageable dès le second trimestre 2011. L'objectif de ce stage sera d'acquérir les techniques de microbiologie classique ainsi que les techniques de biologie moléculaire pour le phylotypage des souches de *R. solanacearum*, pratiquées au laboratoire de phytopathologie du PRAM.

Protocole d'isolement de *Ralstonia solanacearum* à partir d'un échantillon de plante (après dilacération des tissus)

- Prélever les plantes entières, et les ramener au laboratoire.
- Utiliser un outil désinfecté entre chaque échantillons (Ethanol 70% ou NaOCl 1.2%, ou flambé à l'alcool 95°).
- Laver les racines et la tige au niveau du collet à l'eau courante + alcool 70°
- Couper un fragment de tige d'environ 2 cm, près du collet, avec un sécateur ou scalpel désinfecté (Ethanol 70% ou NaOCl 1.2%, ou flambé à l'alcool 95°)

Sous hotte à flux laminaire, ou près d'une flamme :

- Tremper ce fragment dans l'Ethanol 95%, puis flamber
- Transférer le fragment en boîte de Pétri 90, stérile
- Ajouter environ 5 mL de Tris 0.01M pH7.2 sur les morceaux, et refermer la boîte
- A l'aide d'un scalpel et pinces stériles, dilacérer le fragment de tige
- Laisser macérer 15 à 20 minutes, à température ambiante, sous la hotte
- A l'aide d'une anse 10µL (plastique, à usage unique), prélever une goutte de macérat
- Etaler sur milieu SMSA (milieu semi-sélectif), ou à défaut sur milieu Kelman K+ (non sélectif), sur 3 secteurs :



- Incuber à 28°C, pendant 24h
- Les colonies isolées (sur le secteur 3 de la boîte), caractéristiques de *R. solanacearum* (muqueuses, ovoïdes, blanches, au centre rosé rouge) sont alors prélevées pour repiquage de purification (cad: étaler sur milieu SMSA (milieu sélectif), ou à défaut sur milieu K+ (non sélectif), sur 3 secteurs.

Protocole de conservation des souches de *Ralstonia solanacearum* à température ambiante

- Les colonies purifiées, caractéristiques de *R. solanacearum* (muqueuses, ovoïdes, blanches, au centre rosé rouge) sont alors prélevées pour repiquage avant mise en collection sur milieu CPG (cad: Etaler sur milieu CPG (non sélectif, et sans TTC), sur 3 secteurs :
- Préparation des microtubes de conservation
Avec une micropipette, injecter 1 à 2 mL (suivant les tubes choisis) d'eau distillée stérile par tube, sous hotte à flux laminaire. Refermer les tubes.
- Stockage d'une souche
A partir d'une culture de 1 à 2 jours sur CPG ou Kelman K+, prélever une colonie en raclant 1 anse 1µL par mL d'eau distillée stérile. Transférer le contenu de cette anse dans un tube d'eau distillée stérile. Refermer le tube, puis passer au vortex pour homogénéiser la suspension. Bien identifier le tube (N° de la souche, date de mise en conservation & enregistrement d'informations complémentaires dans cahier d'enregistrement des échantillons).

Ces souches en collection peuvent être repiquées tous les 6-8 mois selon l'aspect des solutions.

- Remise en culture
Sous hotte, prélever une à deux anses 10µL dans le tube de conservation. Etaler cette anse sur milieu K+ ou CPG.

Annexe 3

Milieux de culture pour l'agent *Ralstonia solanacearum*

1. Milieu SMSA modifié

(Elphinstone et al 1996, cité par Schaad, Jones & Chun (2001))

Casamino acids	1 g
Peptone	10 g
Glycérol	5 mL
Agar	17 g
Eau distillée	q.s.p. 985mL
Ajuster le pH à 7.2	

Après autoclavage (120°C / 20 min), refroidir le milieu à 50°C puis ajouter :

TTC : 50 mg	1 mL de solution-mère
Crystal violet : 5 mg	0.5 ml de solution 1%
Polymyxine B sulfate : 100 mg	10 mL de solution 1%
Bacitracine : 25 mg	2.5 mL de solution 1%
Chloramphénicol : 5 mg	0.5 mL de solution 1%
Pénicilline G : 0.5 mg	0.5 mL de solution 0.1%

Solutions-mères d'antibiotiques à 1% : 100 mg / 10 mL Ethanol 70°,

sauf pour Polymyxine B sulfate : 300 mg/ 30 mL

Solution Pénicilline G 0.1% : 30 mg dans 30 mL d'eau bidistillée, puis stérilisation par filtration
0.2 µm

2. Milieu de Kelman modifié (milieu K+)

Bacto Peptone	10 g
Glucose	5 g
Casamino acids	1 g
Yeast Extract	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

pH 7.2 (NaOH)

Clhore de Tétrazolum TTC (50 mg/ml) 1 ml, à **ajouter après autoclavage à 120°C/ 20 minutes**

3. Milieu CPG (milieu Casamino Peptone Glucose)

Bacto Peptone	10 g
Glucose	5 g
Casamino acids	1 g

Yeast Extract	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

pH 7.2 (NaOH)

Autoclaver 120°C/ 20 minutes.

4. Tampon Tris 0.01M, pH 7.2

Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	1.211 g
Eau distillée	1000 mL

Ajuster à pH 7.2 (HCl dilué)
Autoclaver 120°C/ 20 min.

Annexe 4

Milieu SMSA modifié

(Elphinstone et al 1996, cité par Schaad, Jones & Chun (2001))

	<i>Pour 1000ml</i>	<i>Pour 900ml</i>	<i>Pour 800ml</i>	<i>Pour 700ml</i>	<i>Pour 600ml</i>	<i>pour 500ml</i>	<i>Pour 400ml</i>	<i>Pour 300ml</i>	<i>Pour 200ml</i>	<i>Pour 100ml</i>
Casamino acids	1	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10
Peptone	10	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00	3.00	2.00	1.00
Glycérol	5	4.50	4.00	3.50	3.00	2.50	2.00	1.50	1.00	0.50
Agar	17	15.30	13.60	11.90	10.20	8.50	6.80	5.10	3.40	1.70
Eau permutée	985	886.50	788.00	689.50	591.00	492.50	394.00	295.50	197.00	98.50

Ajuster le pH à 7.2

Après autoclavage (120°C / 20 min), refroidir le milieu à 50°C puis ajouter :

		<i>Pour 1000ml</i>	<i>Pour 900ml</i>	<i>Pour 800ml</i>	<i>Pour 700ml</i>	<i>Pour 600ml</i>	<i>pour 500ml</i>	<i>Pour 400ml</i>	<i>Pour 300ml</i>	<i>Pour 200ml</i>	<i>Pour 100ml</i>
TTC : 50 mg	Solution-mère	1	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10
Crystal violet : 5 mg	Solution à 1%	0.5	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05
Polymyxine B sulfate : 100 mg	Solution à 1%	10	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00	3.00	2.00	1.00
Bacitracine : 25 mg*	Solution à 1%	2.5	2.25	2.00	1.75	1.50	1.25	1.00	0.75	0.50	0.25
Chloramphénicol : 5 mg	Solution à 1%	0.5	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05
Pénicilline G : 0.5 mg	Solution à 0,1%	0.5	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05

Solutions-mères d'antibiotiques à 1% : 100 mg / 10 mL Ethanol 70° ,

sauf pour Polymyxine B sulfate : 300 mg/ 30 mL d'eau distillée stérile et filtration 0,2µm

Solution Pénicilline G 0.1% : 30 mg dans 30 mL d'eau bidistillée, puis stérilisation par filtration 0.2 µm

*en cas de forte contamination par bactéries saprophytes, la concentration de bacitracine peut être augmentée à 300 mg.L-1. Dans ce cas préparer une solution -mère à 10% (1g dans 10ml ethanol à 70°) et ajouter 3ml/L de milieu

